

平成 22 年 4 月 16 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890086

研究課題名（和文）GSK3 $\beta$  阻害に基づく新しいがん治療法と抗がん剤、放射線感受性の修飾効果研究課題名（英文）A new strategy for cancer treatment targeting GSK3 $\beta$  and its effect on cancer cells susceptibility to chemotherapy and radiation

研究代表者

金 明 姫 (JIN MINGJI)

金沢大学・がん研究所・研究員

研究者番号：90507435

研究成果の概要（和文）：

glycogen synthase kinase (GSK)-3 $\beta$  は基幹的細胞機能を調節する多機能セリン・スレオニンキナーゼである。インスリン経路、神経細胞や造骨細胞に対する病的作用から GSK3 $\beta$  は糖尿病、神経変性疾患や骨粗鬆症の創薬標的として注目されている。我々は、正常細胞の Wnt 経路制御作用からがん抑制的に働く機能分子と認識されている GSK3 $\beta$  の消化器がんや呼吸器がんへの関与に着目した。そして、GSK3 $\beta$  の過剰発現やそのリン酸化による酵素活性調節の破綻が腫瘍細胞の生存や増殖を維持・推進するという、Wnt 経路抑制機能とは異なる消化器がんへ共通の病的作用を発見した。この発見に基づいて、GSK3 $\beta$  阻害による抗腫瘍効果が大腸がんや膵がん細胞とそれぞれの担がん動物モデルで実証し、本酵素が新しいがん治療標的であると提唱した。GSK3 $\beta$  阻害による制がん効果の分子メカニズムは細胞周期制御とがん抑制分子経路や細胞老化の誘導によることを明らかにした。また、GSK3 $\beta$  阻害により、消化器がん細胞に対する抗がん剤や放射線の効果が増強することを見出した。これらの結果は、消化器がんにおける GSK3 $\beta$  の病的作用と GSK3 $\beta$  阻害による新しいがん治療法開発の理論根拠である。消化器がんとは異なり、肺がんでは GSK3 $\beta$  の異常や病的作用は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

Glycogen synthase kinase (GSK)-3 $\beta$  is a serine/threonine protein kinase that regulates fundamental cellular pathways. GSK3 $\beta$  has emerged as a therapeutic target for common chronic diseases including type 2 diabetes mellitus, neurodegenerative disorders, inflammation and osteoporosis. This is based on its currently known functions and primary pathologic causalities. GSK3 $\beta$  has well characterized roles in the regulation of gene transcription and in oncogenic signaling. In this study, we have shown that deregulated GSK3 $\beta$  promotes gastrointestinal, pancreatic and liver cancers. We have demonstrated that inhibition of GSK3 $\beta$  attenuates cancer cells survival and proliferation, induces cell senescence and apoptosis and sensitizes tumor cells to chemotherapeutic agents and ionizing radiation. This has led us to propose GSK3 $\beta$  as a potential therapeutic target in gastrointestinal cancer. The anti-tumor effects of GSK3 $\beta$  inhibition are mediated by changes in expression and phosphorylation of molecules critical to the regulation of cell cycling, proliferation, and apoptosis. These molecular and cellular changes underlie the pathological roles of GSK3 $\beta$  in cancer. Investigation of the mechanisms responsible for deregulation of GSK3 $\beta$  and the consequent downstream pathologic effects in cancer cells will allow exploration of novel therapeutic strategy for gastrointestinal cancer that target aberrant GSK3 $\beta$ . Unlike gastrointestinal cancer, neither pathological property nor function of GSK3 $\beta$  was observed in respiratory tract cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総 計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵がん, 肺がん, 分子標的, GSK3 $\beta$ , 治療

## 1. 研究開始当初の背景

糖代謝経路のインスリンシグナルの下流で発見された GSK3 $\beta$  は細胞周期, 増殖・分化, アポトーシスや細胞骨格・運動能など多彩な細胞生命現象を制御するセリン・スレオニンリン酸化酵素である. GSK3 $\beta$  には, 正常細胞で Wnt をはじめとする増殖シグナルの抑制機能があり, 腫瘍学領域ではこの一部の機能が突出して解析されてきた. その結果, がん細胞における GSK3 $\beta$  のシグナル制御機構においても, 正常細胞における機能解析から提唱されている「がん抑制因子」という認識を大前提として, 実験的根拠がない状態で理論が構築されてきた. しかし上述のように, より広い細胞生命現象における本酵素の関与に着目して当研究室では, 細胞生存と増殖の調節破綻を本態とするがんにおける GSK3 $\beta$  の発現, 活性と, その阻害によりがん細胞に生じる変化を, Wnt シグナルが高頻度に活性化している大腸がんを中心に解析してきた. その結果, GSK3 $\beta$  の過剰発現や自身のリン酸化による活性調節機構の破綻ががん細胞の生存と増殖を維持・推進するという, 従来の Wnt 経路制御作用から全く予測されていなかった「がん促進機能」を発見した. この知見に基づいて, GSK3 $\beta$  阻害の制がん効果を培養大腸がん細胞と担がん動物モデルにおいて検証することにより, 本酵素が大腸がんの新しい治療標的であることを同定・実証した(特願2005-000133; PCT/JP2006/300160; 国際出願 2007). 同時に, 本酵素を治療標的分子として評価するために, 非放射性酵素活性測定法(non-radioisotopic *in vitro* kinase assay; NRIKA)を考案, 開発し, がん細胞における GSK3 $\beta$  活性の検出と小分子阻害剤の酵素活性阻害効果の検証に有用であることを確認した.

## 2. 研究の目的

これまでの大腸がんの解析から得られた研究成果を発展させ, 本研究では, 従来の化学療法や放射線治療に耐性を示し, このため新しい治療法を必要としている膵がんや肺がんなどの難治性がんを中心に, GSK3 $\beta$  阻害によるがん抑制効果を多角的に検討する. 具体的には, GSK3 $\beta$  阻害ががん細胞の生存, 増殖やアポトーシスにおよぼす効果, 抗がん剤や放射線治療の感受性に対する修飾効果と, がん細胞における GSK3 $\beta$  阻害効果に伴う細胞内分子の発現やリン酸化などの変動を解析する.

その結果に基づいて, 異なるがん種に共通する GSK3 $\beta$  のがん促進作用の検証と, 本酵素阻害に基づく制がん効果の分子細胞機構を解明する. また, 本学薬学系研究科のグループと共同開発に着手している新規の小分子 GSK3 $\beta$  阻害剤が合成できれば, そのがん抑制効果や薬剤としての分子特性を検討する. 本研究課題を通じて, GSK3 $\beta$  を標的にする新しいがん治療法の理論を確固なものにする実験的根拠を示し, それに基づくがん治療薬開発の基盤とすることを目的とする.

## 3. 研究の方法

### (1) 各種膵がんと肺がん細胞における GSK3 $\beta$ の発現, 活性と病的作用の検討

複数の膵がん(4種類)と肺がん(腺がん4種類; 扁平上皮がん3種類)由来培養細胞について, GSK3 $\beta$  の発現を免疫ブロッティングと蛍光抗体染色により検出する. これらの細胞における酵素活性は, リン酸化ペプチド特異抗体(S9, 不活性型分画; Y216, 活性型分画)を用いる免疫ブロッティング法による比較解析と, NRIKA 法による活性検出を組み合わせる. とくに肺がんでは, 腺がんと扁平上皮がんにかけて比較解析する.

### (2) GSK3 $\beta$ 阻害による制がん効果の検討とその分子メカニズムの解析

(a) 上記の培養細胞を用いて, 小分子阻害剤(SB-216763, AR-A014418 など)や RNA 干渉によりがん細胞の生存(MTT アッセイ), 増殖(BrdU 取込み試験)やアポトーシス(DNA 断片化 ELISA)の誘導を観察する.

(b) GSK3 $\beta$  阻害によるがん関連分子の発現変動: GSK3 $\beta$  に対する特異性が高いことが証明されている阻害剤(AR-A014418)と RNA 干渉を使用し, 以下の分子経路を対象に機能解析する.

- Mdm2-p53-p21 経路への影響: GSK3 $\beta$  による Mdm2 中央ドメインのリン酸化が p53 のユビキチン化分解に必要であることが報告されている. そこで, GSK3 $\beta$  阻害によりがん細胞の p53 や p21 の発現が変化するかを解析する. そして, p53 遺伝子変異の有無との関連もあわせて, GSK3 $\beta$  阻害によるアポトーシス誘導との関連を検討する.

- cyclin D1-CDK6-Rb 経路への影響: cyclin D1 は GSK3 $\beta$  の基質であり, 我々の予備解析では, GSK3 $\beta$  が CDK6 の発現を制御しているこ

とが示唆されている。そこで、GSK3 $\beta$  阻害により CDK4/6 の発現や Rb リン酸化が変化するかを、リン酸化ペプチド抗体などを用いて観察する。

- c-Myc 安定性：c-Myc には細胞増殖とアポトーシス誘導という相反機能が知られ、近年は、とくにがん細胞において後者を支持する知見が集積されてきている。GSK3 $\beta$  は c-Myc の第 58 スレオニン (T58) をリン酸化してそのユビキチン分解を誘導することが知られている。そこで、GSK3 $\beta$  阻害によりがん細胞の c-Myc の発現あるいは安定性が変化するかを解析し、細胞増殖能やアポトーシス誘導との関連を検討する。また、c-Myc のアポトーシス誘導には p53 経路の関与が示唆されていることから、p53 および関連分子の発現変化とも併せて検討する。

- (3) GSK3 $\beta$  阻害による抗がん剤や放射線照射の感受性修飾効果の検討とそれに伴う分子メカニズムの解明

転移性腫瘍も含めて難治性がんの多くは、がん化学療法や放射線治療に耐性を示す。この観点から、我々は現在、神経膠芽腫の解析により、低用量の GSK3 $\beta$  阻害剤の併用が既存の抗がん剤の効果を相加的あるいは相乗的に増強し、同量の阻害剤による前処置が腫瘍細胞の放射線感受性を有意に亢進させることを発見し、その分子機構を明らかにした。この予備データに基づいて、膵がんと肺がん細胞を対象に、GSK3 $\beta$  阻害が抗がん剤や放射線感受性に及ぼす効果や、増感効果が認められる場合には、その分子メカニズムを検討する。抗がん剤については、とくに、膵がんと肺がんの化学療法に共通して使用されている塩酸ゲムシタピンの感受性との関係を重点的に検討する。併用効果がみられる場合には、イソボログラムの手法により、相加的あるいは相乗的であるかを判定する。

- (4) GSK3 $\beta$  阻害によるがん細胞移植マウスの治療試験、抗がん剤や放射線との併用試験と有害事象の検討

当研究室では、GSK3 $\beta$  阻害剤の腹腔内投与により 5 週間の経過で、ヌードマウス移植ヒト大腸がん細胞 (SW480) の増殖が阻害剤の濃度に依存して抑制され、アポトーシスが誘導されることを実証し、本研究では、*in vitro* の解析に用いる膵がん細胞と肺がん細胞の一部を用いてヌードマウス皮下に移植し、GSK3 $\beta$  阻害剤の腫瘍増殖抑制効果を検証する。また、前項の解析結果に基づいて、GSK3 $\beta$  阻害剤と塩酸ゲムシタピンや放射線照射との併用効果についても検討する。

- (5) 新規 GSK3 $\beta$  阻害のがん細胞に対する効果

と、薬剤に適する分子特性の試験

2008 年度から本学薬学系精密分子構築学 (向 智里教授) の研究グループとの共同研究として、新規 GSK3 $\beta$  阻害剤の開発を計画した。実際には、GSK3 $\beta$  活性ドメインの構造、既存の阻害剤の分子構造、P 糖蛋白質などのがん細胞の薬物輸送特性や消化管上皮細胞の物質輸送特性などを勘案するとともに、がん細胞に対する親和性、経口投与の可能性も考慮して出来るだけ多くの化合物を合成する。この目的に合致する化合物が得られる場合には、GSK3 $\beta$  活性阻害効果を、申請者の研究室で確立された NRIKA 法により測定する。そして、本研究で使用する膵がんと肺がん細胞について、細胞生存や増殖に対する当該化合物の効果を試験する。

#### 4. 研究成果

- (1) 膵がんと肺がん細胞における GSK3 $\beta$  の発現、活性と病的作用の検討

膵がん、胃がん、肝がん細胞と神経膠芽腫では GSK3 $\beta$  の発現、第 216 チロシンのリン酸化 (活性型) と酵素活性は正常細胞に比べて亢進し、第 9 セリンのリン酸化 (不活性化型) は減弱していた。したがって、GSK3 $\beta$  の病的作用はこれらの消化器がんや脳悪性腫瘍に共通していると考えられた。一方、肺がんでは同様の結果は得られなかった。

- (2) GSK3 $\beta$  阻害による制がん効果の検討とその分子メカニズムの解析

(a) 上記のがん細胞の GSK3 $\beta$  の活性や発現を阻害すると、がん細胞の生存、増殖が抑制され、アポトーシスが誘導された。アポトーシスは DNA のラダー状断片化と annexin V 標識による FACS 解析により確認した。

(b) GSK3 $\beta$  阻害によるがん抑制の分子メカニズムは、RNA 干渉や小分子阻害剤を用いて検討した。その結果、膵がんでは p53 と c-Myc 経路が変動し、神経膠芽腫では p53/p21 と CDK6/Rb がん抑制分子経路が活性化されることを見出した。大腸がん細胞の cDNA マイクロアレイ解析では、GSK3 $\beta$  阻害により JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase) と p53AIP1 (p53-regulated apoptosis-inducing protein 1) の発現が誘導された。個別分子の解析により JNK1 と c-Jun のリン酸化および、p53AIP1 と p53IP (p53 induced protein) の発現が GSK3 $\beta$  阻害により誘導された。

- (3) GSK3 $\beta$  阻害による抗がん剤や放射線照射の感受性修飾効果の検討とそれに伴う分子メカニズムの解明

神経膠芽腫と同様に、GSK3 $\beta$  阻害剤はがん化学療法や放射線治療に耐性を示す膵がん細胞 (PANC-1) のゲムシタピンや放射線に対する

感受性を有意に高めた。その分子メカニズムの1つとして、GSK3β阻害によるCDK6/Rb細胞周期制御経路の活性化であることを見出した。種々のヒト肺癌細胞についても検討したが、組織型(扁平上皮がん, 腺がん)に関係なく、GSK3β阻害の抗腫瘍効果あるいは抗がん剤, 放射線感受性に対する増感効果は認められなかった。

(4) GSK3β阻害によるがん細胞移植マウスの治療試験, 抗がん剤や放射線との併用試験と有害事象の検討

膵がん細胞(PANC-1)の移植動物モデルでは、GSK3β阻害剤の投与により、有害事象をとまわずに腫瘍増殖が抑制され、ゲムシタピンの抗腫瘍効果を増強した。上記の理由により、肺癌細胞については検討しなかった。

(5) 新規GSK3β阻害剤のがん細胞に対する効果と、薬剤に適する分子特性の試験

本学薬学系精密分子構築学のグループにより、GSK3β阻害剤AR-A014418の構造を模倣して3種類の新規小分子化合物を合成した。これらの化合物について、がん細胞由来のGSK3βに対する活性阻害効果やがん細胞の増殖抑制効果を解析したが、本研究期間内には一定の成果は得られなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. Jin MJ, Kawakami K, Fukui Y, Tsukioka S, Oda M, Watanabe G, Takechi T, Oka T, Minamoto T. Different histological types of non-small cell lung cancer have distinct folate and DNA methylation levels. *Cancer Sci* 100 (12): 2325-30, 2009. 査読有
2. Mai W, Kawakami K, Shakoori A, Kyo S, Miyashita K, Yokoi K, Jin MJ, Shimasaki T, Motoo Y, Minamoto T. Deregulated glycogen synthase kinase 3β sustains gastrointestinal cancer cells survival by modulating human telomerase reverse transcriptase and telomerase. *Clin Cancer Res* 15 (22): 6810-9, 2009. 査読有

[学会発表] (計4件)

1. Jin M, Kawakami K, Ishigaki Y, Shakoori A, Kitano A, Chikano Y, Shimasaki T, Motoo Y, Minamoto T. Glycogen synthase kinase (GSK) 3β sustains colon cancer cells survival by modulating JNK-mediated pathway. 第68回日本癌学会総会学術集会, 2009年10月1-3日, パシ

フィコ横浜(神奈川県).

2. Kawakami K, Matsunoki A, Jin M, Saito K, Watanabe G, Minamoto T. Augmentation of LINE-1 expression is a possible mechanism underlying cytotoxic effect of 5-FU in colorectal cancer. 第68回日本癌学会総会学術集会, 2009年10月1-3日, パシフィコ横浜(神奈川県).
3. Kitano A, Shimasaki T, Ishigaki Y, Chikano Y, Jin M, Miyamoto K, Motoo Y, Kawakami K, Minamoto T. Pathological roles for glycogen synthase kinase (GSK) 3β in proliferation and motility of pancreatic cancer cells. 第68回日本癌学会総会学術集会, 2009年10月1-3日, パシフィコ横浜(神奈川県).
4. Kawakami K, Jin M, Saito K, Matsunoki A, Mai W, Watanabe G, Minamoto T. Allele-specific inhibition of thymidylate synthase expression by small interfering RNA. 100<sup>th</sup> Annual Meeting 2009 of the American Association for Cancer Research, April 18-22, 2009, Denver, CO. (U.S.A.)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金明姫 (Jin Mingji)  
金沢大学・がん研究所・研究員  
研究者番号: 90507435

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし